

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.22.032

重组酶聚合酶扩增技术的研究进展与应用*

廖川 综述, 韦贵将 审校

广西壮族自治区百色市右江民族医学院附属医院检验科, 广西百色 533000

关键词: 重组酶聚合酶扩增技术; 核酸检测; 病原微生物; 食品安全; 新型冠状病毒肺炎**中图分类号:** R446.5**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2022)22-3145-05

在核酸检测方面,目前应用最广泛的是聚合酶链反应(PCR),但由于 PCR 具有对温控设备过度依赖、热循环过程耗时、操作专业化等特点,很难应用于现场检测。而由英国 TwistDx Inc 公司于 2006 年开发的重组酶聚合酶扩增(RPA)技术,则被称为是可以替代 PCR 的新型核酸检测技术^[1]。虽然 RPA 技术从开发至今只有短短十余年,但其原理却被广泛应用于各个领域。且近年来 RPA 技术的发展速度达到了一个新的高度。RPA 技术最大的亮点就是可在 37~42 °C 条件下进行扩增反应,无需通过高温解链,不依赖于复杂的热循环仪,在常温下即可完成扩增过程,并且核酸扩增速度极快,约 20 min 就可以获得目的扩增产物,可真正实现现场快速核酸检测。

1 RPA 技术的基本原理

RPA 技术主要依赖于两种酶:重组酶 T4 UvsX 和枯草芽孢杆菌 DNA 聚合酶 I (Bsu)。此外,RPA 反应体系还需要扩增模板、引物和各种原料等。RPA 的基本反应过程:首先,在腺嘌呤核苷三磷酸水解供能下,重组酶与 RPA 引物结合形成重组酶引物复合物,该复合物能在模板链中寻找与之同源的序列,一旦引物复合物找到该同源序列,它就会插入模板链中并形成 D-环结构,启动链置换反应,被替换的那条模板链与单链结合蛋白(SSB)结合以保持单链稳定。其次,重组酶在进行链交换后,从复合物中分离,并可用于下一对引物。DNA 聚合酶从引物的 3'-OH 端进行链延伸,形成新的互补链。以上步骤重复进行,就可以实现对模板上的目标区域进行指数式扩增。整个过程进行得非常快,一般约 20 min 获得可检出水平的扩增产物^[2]。

2 RPA 与 PCR 及其他恒温扩增法的对比

RPA 最大的优点为可以在 37~42 °C 的条件下进行反应,无需 PCR 的热循环过程,且具有较高的灵敏度和特异度;在所有恒温扩增法中,RPA 是最为简便的方法,它既不需要像以转录为基础的扩增技术一样,反应循环过程需重复加酶,操作复杂,也不需要 PCR 中的高温解链及退火等过程。这一特点使 RPA 操作更加简单,更适合现场实时检测。

3 RPA 的具体应用

3.1 RPA 在细菌检测中的应用

3.1.1 RPA 在革兰阴性菌检测中的应用 对于革兰阴性菌,由于传统的细菌培养法耗时较长,不适合于临床应用,因此研究者急需寻找新的方法来快速准确地检出各种革兰阴性致病菌。WANG 等^[3]建立了一种基于 RPA 和 3 段侧向流动条的双检测生物传感器,该生物传感器构建了霍乱弧菌和创伤弧菌两个目标的双链 RPA 反应,该方法具有灵敏度高、特异度高、反应时间短、设备简单等优势,非常适合于基层医院和现场实时检测。与其他细菌不同的是,创伤弧菌可以进入活的非可培养状态,使其不能被常规方法所检测到。李伟等^[4]用建立的添加扩增内标的 RPA 技术来检测水产品中的创伤弧菌,并通过设计引物对,将人工构建的扩增内标引入 RPA 体系来克服假阴性问题,这对于防止创伤弧菌感染有极大的意义。LIU 等^[5]通过 RPA 快速检测鲍曼不动杆菌及其耐碳青霉烯类耐药基因,这对于指导临床用药、避免或延缓耐药菌株的产生具有极其重要的意义。以上研究均表明了 RPA 在革兰阴性菌检测上的优势及最新研究进展。

3.1.2 RPA 在革兰阳性菌检测中的应用 革兰阳性菌也是临床上常见的致病菌,建立快速检出方法对于其临床早期诊断、治疗和预后是非常有意义的。吴华等^[6]根据金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因序列,设计了特异性引物并建立了利用 RPA 技术快速检测金黄色葡萄球菌的方法,结果显示,RPA 技术能扩增金黄色葡萄球菌的特异基因序列,且最低检测限为 10 CFU/mL,表明该研究建立的金黄色葡萄球菌的 RPA 检测方法具有较高的特异度和灵敏度。利用 RPA 技术与国际标准培养法同时检测被金黄色葡萄球菌污染的牛奶,二者检测结果一致,但相比于标准培养法,RPA 技术具有快速、简单、方便等优点,适合于临床病例的快速确诊。炭疽是一种烈性传染病,对人类极具威胁,根据世界动物卫生组织规定,一经发现炭疽必须通报,因此人们一直很重视炭疽杆菌的快速准确检出。王素华等^[7]根据炭疽杆菌 BA5345 保守

* 基金项目:广西壮族自治区科技计划项目(2019JJB140034)。

序列建立了 39 °C 恒温水浴锅检测炭疽杆菌的 RPA 方法,该方法能特异性检测炭疽杆菌,灵敏度也较高,其检测炭疽杆菌的最低下限 100 copy/ μ L,与实时荧光定量 PCR 相当,是常规 PCR 的 100 倍。该研究还将 RPA 技术用于被炭疽杆菌污染的毛皮标本检测,其检出率为 65.71%,比实时荧光定量 PCR 的检出率(71.43%)低,但远远高于常规 PCR 的检出率(42.86%)。该研究结果表明,RPA 技术能快速、准确地检测炭疽杆菌,其对于炭疽杆菌感染的预防控制有较大的临床意义。此外,RPA 技术还被用于检测伯克霍尔德氏菌、结核分枝杆菌等^[8-9]。在这些细菌检测实验中,RPA 技术均表现出较高的特异度、灵敏度和检出率,可见 RPA 技术在细菌快速检测方面有其独特的优势。

3.2 RPA 在真菌检测中的应用 目前在医学上对真菌的检测主要是通过它的形态学和生理学等表型进行鉴别,而这些方法往往所需周期长且检出率低。因此迫切地需要寻找一种快速、准确的方法来检测这些真菌。新型隐球菌是一种条件致病菌,多数患者都会有中枢神经系统的感染症状,致死率很高,而目前临床上常用的检测新型隐球菌的方法有墨汁染色法和病原体培养法,虽然病原体培养法是检测的金标准,但是至少需要等待 72 h,不适合临床诊断;而墨汁染色法又受限于检测标本类型,仅能检测脑脊液标本,且检出率偏低,因此这些方法均无法满足临床大量标本的高效即时检测。基于这种情况,刘晔华等^[10]建立了利用 RPA 技术对新型隐球菌的快速检测方法,该研究通过对 10 株实验来源的新型隐球菌株和 100 份临床标本(包括脑脊液 50 份、静脉血 20 份、痰 15 份、胸腔积液、腹水 15 份)进行 DNA 扩增,观察结果发现该检测方法能够快速、准确地检测出新型隐球菌。该研究还对不同的 DNA 提取技术能否影响 RPA 实验结果进行了探索,争取将荧光法 RPA 检测技术用于大量标本的自动化检测。白色念珠菌也是一种常见的致病菌,尽管大多数皮肤及黏膜白色念珠菌的感染者一般不会有生命危险,但它严重降低了人们的生活质量,增加了人们的经济负担,所以需要对它高度重视。虽然目前针对白色念珠菌的检测方法很多,如直接检测法、革兰染色法、培养法等,但由于检测时间较长、检出率较低、检测过程复杂等各种各样的原因都不能完全满足研究者的需要。蒙雨丹^[11]构建了以 RPA 快速检测白色念珠菌的方法并优化其应用,以期待为临床检测提供技术支持;并且为了让该技术能用于床旁、基层甚至家庭检测,还进一步设计了重组酶聚合酶扩增侧流层析技术(RPA-LFD)的快速检测方法,这种方法可以通过肉眼直接快速读取结果,适合未经任何培训的人员操作,可在实时诊断和条件受限的现场检测中得到推广应用。随着 RPA 技术地逐渐

普及,越来越多的真菌可以通过 RPA 技术检测。

3.3 RPA 在病毒检测中的应用 在病毒检测方面,RPA 技术被用于快速高效检测流感病毒。孙宁等^[12]以甲型流感病毒基质蛋白基因、血凝素基因及乙型流感病毒非结构蛋白基因为靶标基因设计引物,建立了反转录酶-重组酶聚合酶扩增(RT-RPA)方法,用于检测流感病毒。在临床上人偏肺病毒感染是较常见的急性病及致死性疾病,且具有较高的流行性,但由于其临床表现缺乏特异度,不易与其他呼吸道病毒感染相鉴别。唐娟等^[13]将临床收治的患儿纳入研究,将 RT-RPA 检测结果与直接荧光免疫法的检测结果对比,以评估 RPA 技术在人偏肺病毒检测中的可行性,实验结果表明,RPA 技术的灵敏度、特异度、准确度均高于直接荧光免疫法,且前者检测速度快、操作简单,更适用于临床病原诊断。近些年来,由于诸如病毒具有遗传和抗原多样性,使其在临床检测中面临较大的挑战。周树青等^[14]设计了基于 RPA 技术的快速检测诺如病毒的方法,该方法可以在 5 min 左右扩增出目的片段,检测限低至 106 copy/ μ L,且实验结果表明,RPA 检测诺如病毒具有较高的特异度,适合于临床病原检测。我国曾是甲型肝炎病毒的高流行区,随着 2008 年灭活疫苗的普遍使用,我国甲型肝炎病毒的感染率和发病率正逐年下降,但目前甲型肝炎病毒感染仍是世界卫生主要问题之一,这提示仍需加强对甲型肝炎病毒的预防控制,早期快速检出病毒是疫情预防控制的关键一步,孙栋良等^[15]建立了快速检测甲型肝炎病毒的 RPA 方法,该方法以甲型肝炎病毒保守核心区域为靶标,实验结果表明,RPA 反应 4 min 时即可检测到目的片段,且检测极限低至 15.6 copy/ μ L。快速、准确地检测出甲型肝炎病毒对于甲型病毒性肝炎的预防控制具有极大地意义。据有关研究报道,RPA 技术还被用于检测猴痘病毒、乙型肝炎病毒等^[16-17]。

3.4 RPA 在寄生虫检测中的应用 自 2006 年 RPA 技术问世以来,RPA 技术被广泛应用于各个领域,在寄生虫的检测方面,已经建立了针对原虫、线虫、吸虫及其他寄生虫的 RPA 方法。

3.4.1 原虫 疟疾是由疟原虫感染引起的虫媒传染病。早期快速诊断是疟疾防治的关键,KERSTING 等^[18]通过 RPA-LFD 靶向扩增恶性疟原虫的 18SrRNA 基因片段,反应在 38 °C 进行,最终实验结果表明,RPA-LFD 对于疟原虫的检测有较高的特异度和灵敏度,且反应条件温和、操作简单,非常适合于偏远地区现场检查,推动了全球疟疾预防控制的进步。在原虫检测方面,RPA 的灵敏度通常高于 PCR,吴耀东^[19]将隐孢子虫卵囊置于浓度为 0.1%月桂酰肌氨酸钠中,使其释放出 DNA 并用 RPA-LFD 进行检查,30 min 内最少可以检测出 0.5 个隐孢子虫卵囊

DNA,其灵敏度优于 PCR。同样,通过含有弓形虫的环境样品中得到的弓形虫卵囊 DNA 为模板,设计特异性探针和引物,可以检测出低至 0.1 个弓形虫卵囊 DNA,灵敏度远远高于 PCR。

3.4.2 线虫 目前对于线虫的检测多采用传统病原学和免疫学方法。异尖线虫是一种重要的食源性人兽共患的寄生虫,人和其他哺乳动物通过食用生的或半生的含有活的异尖线虫Ⅲ期幼虫的鱼而引起异尖线虫寄生虫病。近年来随着人们的饮食方式的改变,对生鱼片和寿司的食用越来越多,异尖线虫寄生虫病的发病率也越来越高,由于异尖线虫寄生虫病往往有异位现象,在临床上,感染异尖线虫患者多会被误诊为肠梗阻、溃疡性结肠炎、胆囊炎等。为了早期快速诊断异尖线虫感染,张春玲等^[20]设计了以 RPA 为原理的异尖线虫快速检测方法,该方法可以特异性扩增异尖科线虫约 340 bp 大小的目的基因片段,并通过与其他寄生虫对比发现 RPA 技术能特异性检测出异尖科线虫,其灵敏度高达 1 pg/ μ L,这对于现场快速检测线虫具有极大的意义。广州管圆线虫也是一种对人类危害极大的寄生虫,它主要引起感染者的炎症和中枢神经系统损伤,而其检测手段 PCR 又过于复杂、昂贵,为了降低检测成本和优化检测方法,JARVI 等^[21]设计了基于荧光重组酶聚合酶扩增技术(EXO-RPA)和 RPA-LFD 来取代 PCR,实验通过 3 种方法来检测来自夏威夷的 35 只蛞蝓是否存在广州管圆线虫 DNA,3 种检查结果一致,检出率均为 65.7%,但是在低感染水平中 EXO-RPA 和 RPA-LFD 的检出率分别是 20.0%和 14.3%。另外为了评估其灵敏度,JARVI 等^[21]克隆了广州管圆线虫的部分 ITS1 基因,并将其稀释为一系列的浓度,范围从 1~100 copy/ μ L,PCR 最低能检测 13 copy/ μ L,EXO-RPA 最低能检测 25 copy/ μ L,而 RPA-LFD 不能在低于 50 copy/ μ L 的情况下持续扩增。此外还有研究者利用 RPA 的双重特性检测寄生虫,方圆等^[22]建立了 RPA 同时快速检测松材线虫和拟松材线虫的双重检测方法,通过松材线虫和拟松材线虫的 ITS 区差异序列,设计了不同的两种上游引物和一种共同的下游引物,通过实验发现当三者的配比达到 5:3:8 时,RPA 扩增效果最好,双重 RPA 方法对检测松材线虫和拟松材线虫的灵敏度分别是 10 pg/ μ L 和 100 pg/ μ L,低于普通 PCR 的灵敏度,但也满足对松材线虫的检测需求,相对于普通 RPA 方法,双重 RPA 方法更为快速高效,为病原体快速检测提供了新的方法。

3.4.3 吸虫 我国比较流行的吸虫主要是日本血吸虫,这是一种人兽共患寄生虫,经过我国近几十年的大力预防控制,日本血吸虫病的感染率正逐年下降,但仍有 6 000 万人面临这种疾病的风险,由于传统的病原学检测手段耗时较长,免疫学检测又存在交叉反

应、较高的假阳性结果及不能区分既往感染和现症感染的缺点,因此不能满足快速准确诊断的要求。郭庆红^[23]以日本血吸虫 G01 片段为检测靶序列,建立了诊断小鼠和羊日本血吸虫病的 RPA-LFD 检测方法,并用这种方法检测了 36 份阳性的小鼠血浆标本和 48 份阳性的羊血浆标本,其灵敏度分别为 97.22%和 93.75%,对所有的阴性标本检测特异度均为 100.00%,其不与其他吸虫产生交叉反应,实验结果表明,RPA-LFD 方法检测日本血吸虫有较高的特异度和灵敏度,因此能够满足快速检测日本血吸虫的临床需要。此外,在寄生虫的快速检测中,RPA 还被用于检测华支睾吸虫等^[24]。作为一种新兴的恒温核酸扩增技术,RPA 在原虫、线虫、吸虫等方面的应用愈发成熟。

3.5 RPA 在食品安全检测中的应用

3.5.1 食源性病原菌 近年来由食源性病原菌导致的食物安全问题层出不穷,如何快速高效地检测食源性病原微生物是确保食品安全的首要前提。郝娟等^[25]运用 RPA 来检测不同种类婴幼儿食品中的克罗诺杆菌,并与传统培养法和 PCR 相对比,结果表明三者的定性结果一致,与后两种方法相比,RPA 体现出了效率上的优势,这表明 RPA 适合于食品安全初筛和现场检测,并有助于应对食品突发事件。此外,兰全学等^[26]还建立了 EXO-RPA 快速检测空肠弯曲杆菌的方法,并通过模拟污染食品检测来分析 EXO-RPA 的实际应用效果,结果表明,在 40 份标本中检测阳性率与 PCR 一致,该研究建立的方法具有特异度高、灵敏度高、抗干扰性强等优势,具有较好的应用前景。

3.5.2 转基因食品 随着转基因技术的发展及更多转基因食品流进市场,转基因食物的安全问题备受人们的关注。许多国家和地区都对转基因作物建立了相关的监管制度,这就需要有足够准确的转基因检测方法。目前检测转基因的方法主要有基于蛋白质水平和核酸水平两大类,前者受限于蛋白质变性、检测试剂等各种原因而无法进行大规模转基因作物检测,后者中的 PCR 技术具有较高的灵敏度和特异度,但 PCR 需要复杂昂贵的热循环仪,且操作过程复杂,费时费力,不适合于现场检测,为了解决这些问题,谢实龙^[27]针对 MON89788(较早被批准用于商业化种植的转基因大豆品种)的特异性基因序列设计了相应的引物和探针,以 RPA 技术快速检测转基因大豆,并用该方法检测收集到的 8 个大豆品种,以反转录 PCR 检测为对照组,结果显示,RPA 检测大豆转基因特异度强,最低检测限度可达 40 copy/ μ L,且检测时间为 3.36~7.72 min,能够实现现场快速、大量检测转基因大豆。此外,窦雯等^[28]对 RPA 反应温度和时间进一步优化,建立了转基因大豆检测体系,并利用这种

方法对南京市市场上出售的豆芽菜和新鲜豆荚进行检测。目前, RPA 在食品安全快速检测方面的应用已经愈发成熟, 但是在转基因食品检测中的报道还是比较少, 这需要研究者加强对 RPA 的研究, 进一步优化 RPA 检测的条件。

3.6 RPA 在新型冠状病毒检测中的应用 虽然目前我国新型冠状病毒肺炎疫情已经基本控制, 但仍有少数病例不时出现, 并且这种情况将持续相当长的时间。另外, 由于当前没有针对新型冠状病毒肺炎的有效抗病毒药物, 因此, 疫情预防控制工作最重要的仍是早期确诊、早期隔离。据调查, 有超过一半的新型冠状病毒人际传播来源于无症状携带者, 因此对无症状携带者的隔离是限制病毒传播的有效手段, 这就要求必须掌握一种高效准确的检测手段。目前, 检测新型冠状病毒最常用的方法就是核酸检测, 主要有实时反转录荧光 PCR、数字 PCR、各种恒温核酸扩增法, 其中实时反转录荧光 PCR 是应用最为广泛的检测方法。然而实时反转录荧光 PCR 对于阳性患者的检出率仅为 30%~50%, 部分疑似阳性的病例需要多次核酸检测才能得出阳性结果^[29], 且 PCR 检测新型冠状病毒操作复杂、耗时较长、所需仪器较贵, 很难快速筛选出阳性患者, 不利于当前形势下的疫情预防控制。而近些年新兴的 RPA 检测方法则能够快速准确地检测出目标基因序列, 而且操作方便、反应条件简单。有学者报道了基于 RPA 技术快速检测新型冠状病毒的试剂盒, 该试剂盒无需昂贵的设备, 采样后仅需 20~40 min 就可完成现场检测, 而且操作简单易普及, 这对于全球新型冠状病毒肺炎疫情预防控制具有重要的意义^[30]。WANG 等^[31]建立了一种连接和重组酶聚合酶扩增(L/RPA)联合检测方法, 该方法能够快速检测出新型冠状病毒。此外, SUN 等^[32]开发了一种基于反转录-重组酶聚合酶恒温扩增技术和 DNA 核酸内切酶靶向技术的单管检测平台用于检测新型冠状病毒。目前大多数恒温扩增法检测新型冠状病毒都需要两个步骤, 即反转录和恒温扩增、扩增产物的检测, 由于两个步骤会相互干扰, 因此需要在第一个步骤完成以后将扩增产物转移至另一个管, 在转移过程中需要打开扩增反应管, 这就可能造成气溶胶污染, 进而产生假阳性结果, 该平台通过优化反应组分, 将扩增反应的混合物放在管底, 产物检测的混合物放在管盖, 使整个反应在一个管内完成, 减少了气溶胶污染可能性和操作的时间。实验通过使用一系列稀释梯度和不同的冠状病毒来验证其灵敏度和特异性, 结果显示该方法能够在约 50 min 完成扩增, 并且这种方法还可以通过荧光读板器直接读取检测结果, 以实现高灵敏、高通量的新型冠状病毒检测。RPA 恒温扩增法对设备要求较低, 适合于条件有限的急诊科及诊所等地的检测。

4 展 望

作为能够在常温下完成核酸扩增与检测的技术, RPA 在近些年得到了极大的发展。相对于 PCR 及其他恒温扩增法, RPA 具有灵敏度高、特异性高、操作简单、反应快速及对设备要求低等优势, 更适用于条件简陋的现场检测。在灵敏度方面, RPA 最低可检测到标本中的痕量级核酸(尤其是 DNA), 将单个模板分子扩增到可检出水平; 在特异性方面, 该技术可从含有众多来自不同物种的基因组 DNA 的标本中识别并扩增目的基因序列, 具有较强的抗干扰能力。此外 RPA 在恒定的低温(37~42 °C 最适宜)下也可以运行。RPA 对反应条件的温和性及扩增的高效性使该技术非常适合于临床早期快速诊断、食品检测、疫情预防控制、工业应用及现场实时检测。另外, 研究者在原有的优势上进一步优化反应, 比如将 RPA 与 CRISPR-Cas12a 结合^[33]或与 rkdna-石墨烯氧化物(GO)探针系统相结合^[34], 以提高 RPA 的灵敏度和特异性。还有与其他技术相结合的多重 RPA 技术, 一次反应检测多种产物, 极大提高了反应效率^[35]。当然, 作为一种发展时间较短的新兴方法, RPA 也有一定的局限性, 比如至今还没有开发出专门针对 RPA 引物和探针设计的软件, 只能使用 PCR 的软件进行设计和筛选, 导致无法对过短的核酸序列进行扩增, 但这并不能阻止研究者对 RPA 的研究探索, RPA 的优势使它有望成为未来核酸扩增的主流方法。

参考文献

- [1] LOBATO I M, O'SULLIVAN C K. Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances[J]. Trends Analyt Chem, 2018, 98(1): 19-35.
- [2] 施宇雪, 靳晶豪, 陈孝仁. 重组酶聚合酶扩增技术及其在生命科学领域的应用[J]. 江西农业学报, 2021, 33(10): 62-72.
- [3] WANG P, LIAO L, MA C, et al. Duplex on-site detection of vibrio cholerae and vibrio vulnificus by recombinase polymerase amplification and three-segment lateral flow strips[J]. Biosensors (Basel), 2021, 11(5): 151.
- [4] 李伟, 庄濠宇, 温尔英, 等. 添加扩增内标的重组酶聚合酶扩增技术(RPA-IAC)检测创伤弧菌[J]. 检验检疫学刊, 2019, 29(3): 5-8.
- [5] LIU S, HUANG G, GONG Y, et al. Rapid and accurate detection of carbapenem-resistance gene by isothermal amplification in Acinetobacter baumannii[J]. Burns Trauma, 2020, 8(1): 26.
- [6] 吴华华, 王锦鑫, 谷庆花, 等. 金黄色葡萄球菌重组酶聚合酶扩增方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(8): 797-801.
- [7] 王素华, 袁淑辉, 帅江冰, 等. 炭疽杆菌 RPA 等温检测方法的建立和应用[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(6): 590-594.

- [8] SAXENA A, PAL V, TRIPATHI N K, et al. Development of a rapid and sensitive recombinase polymerase amplification-lateral flow assay for detection of *Burkholderia mallei* [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66 (2): 1016-1022.
- [9] XU Y, WU P, ZHANG H, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* based on antigen 85B via real-time recombinase polymerase amplification [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2021, 72(2):106-112.
- [10] 刘晔华, 穆红, 张坚磊, 等. 重组酶聚合酶扩增技术检测新型隐球菌 DNA [J]. *山东医药*, 2020, 60(18):25-29.
- [11] 蒙雨丹. 基于重组酶聚合酶扩增(RPA)技术的白色念珠菌快速检测方法的构建及应用[D]. 泸州:西南医科大学, 2020.
- [12] 孙宁, 于娟, 严孝岭, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在流感病毒检测中的探索性研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2019, 33(5):530-535.
- [13] 唐娟, 刘文毅, 刘霄. 重组酶聚合酶扩增技术在人偏肺病毒快速诊断的方法建立与临床评价 [J]. *医学理论与实践*, 2021, 34(5):729-731.
- [14] 周树青, 杨栋, 金敏, 等. 重组酶聚合酶扩增技术(RPA)快速检测 G II 型诺如病毒 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2020, 38(1):76-78.
- [15] 孙栋良, 杨栋, 金敏, 等. 荧光重组酶聚合酶扩增技术快速检测甲型肝炎病毒 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2020, 38(10):51-53.
- [16] DAVIS D, KISSENKOTTER J, FAYE M, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Monkeypox virus [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2019, 95(1):41-45.
- [17] YI T T, ZHANG H Y, LIANG H, et al. Betaine-assisted recombinase polymerase assay for rapid hepatitis B virus detection [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2021, 68(3):469-475.
- [18] KERSTING S, RAUSCH V, BIER F F, et al. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis [J]. *Malar J*, 2014, 13(1):99.
- [19] 吴耀东. 隐孢子虫和弓形虫重组酶聚合酶扩增检测方法的建立及应用[D]. 北京:中国农业科学院, 2017.
- [20] 张春玲, 张媛媛, 邱阳元, 等. 我国东海沿海鱼类异尖科线虫 RPA 检测方法的建立 [J]. *中国动物传染病学报*, 2021, 29(1):1-8.
- [21] JARVI S I, ATKINSON E S, KALUNA L M, et al. Development of a recombinase polymerase amplification (RPA-EXO) and lateral flow assay (RPA-LFA) based on the ITS1 gene for the detection of *Angiostrongylus cantonensis* in gastropod intermediate hosts [J]. *Parasitology*, 2021, 148(2):251-258.
- [22] 方圆, 吴迅, 林宇, 等. 松材线虫和拟松材线虫双重 RPA 检测研究 [J]. *生物技术通报*, 2021, 37(7):183-190.
- [23] 郭庆红. 日本血吸虫病核酸检测方法的建立和初步应用 [D]. 北京:中国农业科学院, 2021.
- [24] 郝朔. 华支睾吸虫核酸检测方法的建立与初步应用 [D]. 长春:吉林大学, 2020.
- [25] 郝娟, 吴婕, 余之蕴, 等. 重组酶聚合酶扩增法在婴幼儿食品克罗诺杆菌检测中的应用 [J]. *中国乳品工业*, 2020, 48(9):51-53.
- [26] 兰全学, 陈佳平, 杨慧, 等. 食品中空肠弯曲菌荧光重组酶聚合酶扩增检测方法的建立 [J]. *现代食品科技*, 2020, 36(5):304-309.
- [27] 谢宝龙. 转基因成分重组酶聚合酶扩增(RPA)快速检测方法的建立 [D]. 阜阳:阜阳师范学院, 2019.
- [28] 窦雯, 李尤, 逯欣宇, 等. 转基因大豆 RPA 检测技术的建立及应用 [J]. *生物技术通报*, 2019, 35(5):170-175.
- [29] SELVAM K, NAJIB M, KHALID M, et al. RT-LAMP CRISPR-Cas12/13-based SARS-CoV-2 detection methods [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(9):1646.
- [30] 梁瑞英, 梁琳, 贾亚雄, 等. 新型冠状病毒一步法可视化恒温快速检测方法的建立 [J]. *病毒学报*, 2020, 36(6):983-988.
- [31] WANG P, MA C, ZHANG X, et al. A ligation/recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of SARS-CoV-2 [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11(1):680-728.
- [32] SUN Y Y, YU L, LIU C X, et al. One-tube SARS-CoV-2 detection platform based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1):74.
- [33] ZHANG W S, PAN J, LI F, et al. Reverse transcription recombinase polymerase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for facile and highly sensitive colorimetric SARS-CoV-2 detection [J]. *Anal Chem*, 2021, 93(8):4126-4133.
- [34] CHOI M H, LEE J, SEO Y J. Combined recombinase polymerase amplification/rkDNA-graphene oxide probing system for detection of SARS-CoV-2 [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1158(1):338390.
- [35] CHERKAOUI D, HUANG D, MILLER B S, et al. Harnessing recombinase polymerase amplification for rapid multi-gene detection of SARS-CoV-2 in resource-limited settings [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 189(1):113328.

(收稿日期:2021-12-23 修回日期:2022-09-10)